

Comparative molecular approaches to identify host determinants mediating adhesion of E. coli F4 strains in pigs

Doctoral Thesis**Author(s):**

Joller, David

Publication date:

2009

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005931566>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Dissertation ETH number 18518

Comparative molecular approaches to identify host determinants mediating adhesion of *E. coli* F4 strains in pigs

A dissertation submitted to

ETH Zurich

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

David Joller

Dipl. Ing.-Agr. ETH Zurich

born 23rd February 1976

citizen of Dallenwil, Nidwalden

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Peter Vögeli, examiner

Prof. Dr. Hans Ulrich Bertschinger, co-examiner

Dr. Claus B. Jørgensen, co-examiner

2009

Summary

The ability to colonise the intestine is a common feature of pathogenic and non-pathogenic bacteria. Enterotoxigenic *Escherichia (E.) coli* (ETEC) can adhere to the brush borders of small intestine enterocytes by means of fimbriae. ETEC produce toxins that cause a secretory diarrhoea. *E. coli* diarrhoea is the most important source of mortality in newborn and weaned pigs, and causes high losses in the pig industry. Susceptibility is conferred by specific receptors on the brush borders of enterocytes. Three *E. coli* variants carrying F4 fimbriae are known: F4ab, F4ac and F4ad. In most cases, the variant F4ac is isolated in pigs affected by ETEC diarrhoea. The receptor gene for F4ab and F4ac (*F4bcR*) is inherited as an autosomal dominant trait and was mapped to porcine chromosome 13.

A multipoint linkage analysis of eight microsatellites and one single nucleotide polymorphism (SNP) localised the *F4bcR* inside the interval *SW207* – [*MUC4*-8227, *MUC4gt*] – *S0075*. Genotyping and phenotyping data of 331 pigs from the Swiss experimental herd (SEH), 143 pigs from the Swiss performing station (SPS) and 236 pigs from the Nordic experimental herd were used. *F4bcR* was strongly associated with the g.8227C>G polymorphism in *MUC4*. Only 3 of 331 SEH pigs (1%) and 6 of 78 SPS offspring (8%) were discordant between this polymorphism and the phenotype. The *MUC4* g.7947A>G polymorphism was in complete linkage disequilibrium with the g.8227C>G polymorphism in 180 analysed pigs and, therefore, was equally reliable for prediction of susceptibility to *E. coli* F4ab/F4ac infection. We examined further four genes as candidates for the *F4bcR*: *TNK2*, *ST6GAL1*, *CLDN1* and *C3orf21*.

Comparison between the sequences in *TNK2* from two resistant and two homozygous susceptible pigs revealed 112 sequence variants. In further 180 pigs, three of these SNPs were genotyped, but their haplotypes did not coincide with the phenotype in 8.5% of these pigs. None of these three SNPs and the two SNPs in *MUC4* are located in the regulatory regions and change amino acids. Therefore, none of them are strong candidates. No sequence variants were identified in the other three candidate genes.

The number of *E. coli* F4ad that adhered to enterocytes varied considerably in the adhesion test within and between litters of repeated matings. External factors may particularly affect the adhesion strength of F4ad bacteria. Aside from the fully resistant and susceptible adhesion phenotypes, some pigs belonged to an intermediate phenotype with some to many enterocytes devoid of bacteria. Parent pigs with a known phenotype were divided into a resistant, an intermediate and

a highly susceptible class. Adhesion strengths of 1166 offspring from the resulting six mating combinations were recorded. Offspring from highly susceptible parents showed clearly more adhesive enterocytes than offspring from resistant or weak adhesive parents. We therefore conclude that the F4ad adhesion is genetically influenced by one or several receptors.

The *MUC4* g.8227C>G polymorphism, segregating with susceptibility and resistance to *E. coli* F4ab/F4ac, can be used in selection programs, although the underlying genetic variation remains unknown. The current progress in pig genome sequencing will make it possible to find new markers that allow to finally identifying the causal mutation for *F4bcR*.

Zusammenfassung

Die Besiedlung des Darms durch Bakterien ist eine gemeinsame Eigenschaft von nicht-pathogenen und pathogenen Bakterien. Von den pathogenen Bakterien hatten enterotoxigene *Escherichia coli* (*E. coli*) mit ihren Fimbrien an spezifische Rezeptoren auf den Bürstensäumen von Enterozyten im Dünndarm und produzieren Toxine, die bei Ferkeln eine Durchfallerkrankung verursachen. *E. coli* Diarrhö ist die wichtigste Abgangsursache bei neugeborenen Ferkeln und Absetzferkeln und führt zu hohen Verlusten in der Schweineproduktion.

Von den drei bekannten *E. coli* Varianten mit F4 Fimbrien F4ab, F4ac und F4ad wird die F4ac Variante am häufigsten als Verursacherin von *E. coli* Durchfall gefunden. Das Rezeptor-Gen für die *E. coli* F4ab und F4ac Anfälligkeit (*F4bcR*) wird autosomal dominant vererbt und wurde auf dem Schweinechromosom 13 kartiert.

Mit einer Kopplungs-Analyse von acht Mikrosatelliten und einem einfachen Sequenzpolymorphismus (SNP) wurde der Bereich für den *F4bcR* auf das Intervall SW207 – [*MUC4*-8227, *MUC4*gt] – S0075 eingegrenzt. Dazu wurden Daten der Phänotypen und Genotypen von insgesamt 331 Schweinen aus unserer Versuchsherde (SEH), 143 Schweinen aus der Schweizer Schweinepopulation (SPS) und 236 Schweinen der Nordischen Versuchsherde verwendet. *F4bcR* war eng gekoppelt mit dem g.8227C>G Polymorphismus im Kandidatengen *MUC4*. In nur 3 von 331 SEH Schweinen (1%) und 6 von 78 SPS Nachkommen (8%) stimmte der F4ab/F4ac Phänotyp nicht mit dem Polymorphismus überein. Der *MUC4* g.7947A>C Polymorphismus war in 180 analysierten SEH und SPS Schweinen in einem kompletten Kopplungsungleichgewicht mit dem g.8227C>G Polymorphismus und war ebenso aussagekräftig für die Diagnose der Empfänglichkeit auf eine *E. coli* F4ab/F4ac Infektion.

Weitere vier Kandidatengene wurden untersucht: *TNK2*, *ST6GAL1*, *CLDN1* und *C3orf21*. Beim Vergleich der *TNK2* Sequenzen von zwei resistenten und zwei homozygot empfänglichen Tieren wurden 112 Sequenzvarianten gefunden. Drei dieser SNPs wurden in 180 SEH und SPS Schweinen untersucht, ihr Haplotyp stimmte jedoch in 8.5% der Fälle nicht mit dem F4ab/F4ac Phänotyp überein. Diese drei SNPs und die zwei SNPs in *MUC4* liegen in Intronsequenzen und sind deshalb keine bedeutenden Kandidaten für *F4bcR*. Gleiches gilt für die Sequenzen der anderen drei Kandidatengene, in welchen keine Sequenzvarianten gefunden wurden.

Bei der Untersuchung der *E. coli* F4ad Adhäsion zeigte sich, dass die Anzahl F4ad an den Bürstensäumen beträchtlich variierte, sowohl innerhalb der Würfe, als auch zwischen den Würfen wiederholter Paarungen. Externe Faktoren beein-

flussen vermutlich die Adhäsionsstärke der *E. coli* F4ad. Neben einem vollständig resistenten und empfänglichen Adhäsionsphänotyp wurde bei einigen Schweinen ein intermediärer Phänotyp gefunden mit einzelnen bis vielen Enterozyten ohne anhaftende Bakterien. Elterntiere mit bekanntem F4ad Phänotyp wurden in eine resistente, eine schwach empfängliche und eine hoch empfängliche Klasse eingeteilt. Der Vergleich der Adhäsionsstärke von 1166 Nachkommen aus den sechs möglichen Paarungskombinationen zeigte, dass Nachkommen hoch empfänglicher Eltern klar mehr Enterozyten mit anhaftenden Bakterien haben als Nachkommen resistenter oder schwach empfänglicher Eltern. Wir schliessen deshalb daraus, dass die *E. coli* F4ad Adhäsion genetisch beeinflusst wird durch einen oder mehrere Rezeptoren.

Der *MUC4* g.8227C>G Polymorphismus segregiert mit der Empfänglichkeit und Resistenz auf *E. coli* F4ab/F4ac und kann für die Selektion verwendet werden, obwohl die zugrunde liegende genetische Ursache unbekannt bleibt. Der gegenwärtige Fortschritt bei der Sequenzierung des Schweinengenoms wird es ermöglichen, neue Marker zu entwickeln und helfen, die kausale Mutation für *F4bcR* zu finden.